

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

Guilherme Pinho do Prado

Avaliação do efeito do cultivo axênico prolongado e da
interação com células MDCK em propriedades de
patogenicidade de um isolado clínico do gênero
Acanthamoeba.

Vitória, ES
2017

GUILHERME PINHO DO PRADO

Avaliação do efeito do cultivo axênico prolongado e da interação com células MDCK em propriedades de patogenicidade de um isolado clínico do gênero *Acanthamoeba*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.
Área de concentração: Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Aloisio Falqueto
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cinthia Furst
Leroy Gomes Bueloni

Vitória, ES
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P896a Prado, Guilherme Pinho do, 1990 -
Avaliação do efeito do cultivo axênico prolongado e da interação com
células MDCK em propriedades de patogenicidade de um isolado clínico do gênero *Acanthamoeba* /
Guilherme Pinho do Prado – 2017.
58 f. : il.

Orientador(a): Aloisio Falqueto.

Coorientador(a): Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. Acanthamoeba. 2. Cultura Axênica. 3. Patogenicidade. 4. Clorexidina. I. Falqueto, Aloisio. II.
Bueloni, Cinthia Furst Leroy Gomes. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



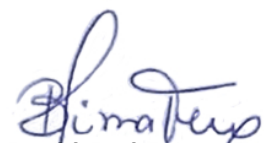
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS


PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO


O mestrando Guilherme Pinho do Prado apresentou a dissertação intitulada “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CULTIVO AXÊNICO PROLONGADO E DA INTERAÇÃO COM CÉLULAS MDCK EM PROPRIEDADES DE PATOGENICIDADE DE UM ISOLADO CLÍNICO DO GÊNERO *Acanthamoeba*” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (☒) **aprovar** (☐) **reprovar** a dissertação habilitando o farmacêutico GUILHERME PINHO DO PRADO a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 21 de julho de 2017.


Prof.ª Dr.ª Blima Fux
(Membro Interno)


Prof.ª Dr.ª Narcisa Imaculada Brant
Moreira
(Membro Externo)


Prof. Dr. Aloisio Falqueto
(Orientador)



Trio Ameba, vilões do desenho animado As meninas super poderosas. Cena adaptada ilustra o tipo de ameaça que estes personagens representam no desenho animado e, conseqüentemente, no imaginário popular.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo cuidado, pois me mantive sadio para realizar este mestrado.

Agradeço aos meus pais, Ederson e Eucileia, pelo apoio incondicional neste período.

Agradeço a minha noiva, Thays, pois, se não fosse por ela, não teria realizado este mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Aloisio Falqueto por gentilmente receber no PPGDI para que eu realizasse esse mestrado e a co-orientadora Prof^a. Dr^a. Cinthia Furst que me cedeu espaço em seu laboratório e permitiu que eu contribuísse para a pesquisa.

Agradeço aos(as) amigos(as) do laboratório de Protozoologia da UFES, Cynara, Débora, Maressa, Diógenes e Raphael Conti, que, com paciência, me ensinaram e me ajudaram em muita das técnicas que realizei neste trabalho.

Agradeço técnicos do departamento Luciana, Steeven e Rodrigo, pois me ouviram e aconselharam naquilo que podiam, bem como me ajudaram nas muitas tarefas relacionadas a essa dissertação.

Agradeço a Gustavo por sempre estar disponível para tirar dúvidas sobre métodos estatísticos que se enquadrassem neste estudo.

Agradeço as colaboradoras da UFMG, Prof^a. Dr^a. Adriana Oliveira Costa, Cecilia e Isabela, que me receberam de braços abertos no período em que passei no laboratório de Parasitologia aprendendo um pouco mais sobre técnicas deste estudo. De maneira especial, agradeço a professora pelo aprendizado transmitido através das discussões do trabalho e pelo grande auxílio na correção do presente texto.

Agradeço a instituição UFES por conceder espaços de formação que vem contribuindo com minha carreira acadêmica desde 2009.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI), na pessoa do Prof. Dr. Moises Palaci, pela oportunidade e pelo auxílio financeiro para a participação em congressos.

Agradeço aos órgãos de fomento a pesquisa Capes e FAPES, pelas condições ofertadas para minha dedicação exclusiva à pesquisa por intermédio de uma bolsa.

RESUMO

As Amebas de Vida Livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* são protozoários encontrados em todos os ambientes do mundo, e podem causar doenças como Ceratite e Encefalite Granulomatosa. Os avanços no conhecimento dessas amebas e de seu processo invasivo, da sua variabilidade fenotípica e genotípica, bem como o desenvolvimento de metodologias diagnósticas e terapêuticas, só têm sido possíveis devido a ferramenta de cultivo desses microrganismos. No entanto, seu cultivo prolongado e sua passagem em hospedeiros (ou células) podem alterar a maquinaria celular e modificar mecanismos relacionados a patogenicidade, tornando-os amebas mais ou menos virulentas. No presente trabalho, procurou-se investigar características *in vitro* associadas à patogenicidade de *Acanthamoeba castellanii* (Genótipo T4), utilizando quatro amostras de um mesmo isolado clínico, originado de raspado de córnea, a fim de investigar sua virulência. Células epiteliais da linhagem MDCK foram utilizadas para verificar o efeito citopático. Também foi avaliado o meio onde as amebas foram cultivadas (meio condicionado) visando verificar a atividade de proteases em gel e o efeito citotóxico gerado em culturas de MDCK. Foram verificadas as porcentagens de encistamento e a resposta da cultura de amebas a partir da exposição à clorexidina. Os dados obtidos nesse trabalho confirmaram o potencial patogênico das amostras, especialmente aquelas que sofreram passagem em MDCK. O meio condicionado não produziu efeito citotóxico significativo sobre a monocamada de células. O perfil zimográfico evidenciou um padrão muito parecido em todas as amostras testadas, diferenciando apenas a amostra de longo período de axenização, havendo o aumento de uma banda de aproximadamente 133 kDa. Foi verificado que a porcentagem de encistamento das amostras recém axenizadas foi maior que as de longo período de axenização, sendo que esta última amostra obteve taxas maiores de encistamento após interação com MDCK. O teste com a clorexidina demonstrou que, apesar da amostra ser oriunda de uma mesma fonte, as condições de manutenção das amostras levaram a comportamentos distintos. Neste trabalho foi observado que após nove anos de cultivo axênico, a ameba perde virulência, contudo a recupera após passagem em células, como a MDCK. Colaborando para que os estudos em *Acanthamoeba* avancem demonstrando a potencialidade plástica da ameba em gerir seu perfil patogênico.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, citopático, MDCK, longo período, clorexidina.

ABSTRACT

The free-living amoeba (FLA) of the genus *Acanthamoeba* are protozoan found in all environments of the world, and can cause diseases such as Keratitis and Granulomatous Encephalitis. Advances do not know the amoebae and their invasive process, their phenotypic and genetic variability, as well as the development of diagnostic and therapeutic methodologies, are only being fulfilled with the microorganisms cultivation tool. However, their prolonged cultivation and their passage into hosts (or cells) can change a cellular machinery and modify mechanisms related to pathogenicity, making them amoebas more or less virulent. In the present work, we investigated *in vitro* characteristics associated with the pathogenicity of *Acanthamoeba castellanii* (Genotype T4), using four samples from a clinical isolate, originating from corneal scraping, in order to investigate its virulence. Epithelial cells of the MDCK lineage lengths for checking the cytopathic effect. It was also evaluated the environment where as amebas were cultured (conditioned medium) to verify the activity of proteases in gel and the cytotoxic effect generated in cultures of MDCK. The percentages of binding and response of the amoeba culture from chlorhexidine exposure were verified. The data obtained in the work confirm the pathogenic potential of the samples, especially those that underwent passage in MDCK. The environment did not produce a significant cytotoxic effect on a cell monolayer. The zimographic profile showed a very similar pattern in all the samples tested, differentiating only one sample from a long period of axenization, with a band of approximately 133 kDa increasing. It was verified that the binding percentage of the newly axenized samples was higher than the development period, and that the latter test obtains higher binding rates after interchange with MDCK. The chlorhexidine test demonstrated that, despite the sample from the same source, as sample maintenance conditions led to different behaviors. In this work was observed in two years of axenic cultivation, an amoeba loses virulence, yet it recovers it after passage in cells, as an MDCK. Collaborate for studies in *Acanthamoeba* advance demonstrating a plastic amoeba's potential in managing its pathogenic profile.

Key words: *Acanthamoeba*, cytopathic, MDCK, long period, chlorhexidine.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<p>Figura 1. Fases evolutivas do gênero <i>Acanthamoeba</i>. A) Fase trofozoítica em microscopia de contraste de fase, evidenciando-se (i) acantopódios, (ii) núcleo e (iii) vacúolo; B) Fase cística de grupo morfológico I; C) Fase cística de grupo morfológico II; D) Fase cística de grupo morfológico III. Escala da barra: 10 µm. (Fonte: Arquivo pessoal).</p>	9
<p>Figura 2. Aspecto histológico da córnea discriminando quatro camadas de células. (Fonte: Figura adaptada do Laboratório de Histologia da <i>Universidad Nacional Autónoma de Honduras</i>, 2014).</p>	11
<p>Figura 3. Infográfico que identifica o histórico por trás de cada amostra utilizada. Raspado de córnea de paciente com CA realizado, cultivado e estocado em ágar soja no ano de 2007. Amostra 1: axenização e cultivo em PYG realizados em 2015, denominando-se RA; Amostra 2: interação de RA com a monocamada de células da linhagem MDCK, denominando-se RA (3x); Amostra 3: amostra axenizada em 2007 e cultivada em PYG até o ano 2016, denominando-se LP ; Amostra 4: interação de LP com a monocamada de células da linhagem MDCK, denominando-se LP (3x).</p>	20
<p>Figura 4. Trofozoítos e cistos em PYG após o 7º dia axenização. A) Trofozoítos (Barra: 20 µm); B) Trofozoíto (trof) e cistos (cist) C) Cistos do grupo morfológico II (Barra: 8 µm); D) Cisto do grupo morfológico II, sendo possível observar ostíolos (ost) e um trofozoíto, podendo observar acantapódios, vacúolos e o núcleo (Barra: 8 µm); E) Trofozoítos dando evidência aos vacúolos (vac) e aos acantapódios (actp) (Barra: 8 µm); F) Trofozoíto dando evidência aos vacúolos e ao núcleo (nuc) (Barra: 8 µm).</p>	25
<p>Figura 5. Efeito citopático sobre células MDCK após 24 horas de incubação a 37° C, induzido por trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> recém axenizada (RA), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [RA (3x)], axênicas por longo período (LP) e axênicas por longo período e interagida por três</p>	26

passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. A imagem dos círculos mostra o aspecto macroscópico dos poços após o período de incubação. As letras acima das barras representam a significância estatística entre os valores de efeito citopático, sendo letras iguais sem diferença ($p > 0,05$) e letras distintas com diferença ($p < 0,05$).

Figura 6. Microscopia de um dos poços da placa antes e depois da exposição aos trofozoítos. **A)** monocamada de células MDCK intactas; **B)** monocamada de células MDCK destruídas por **RA (3x)** (Aumento de 20x). 27

Figura 7. Viabilidade celular após 24 horas de exposição ao meio condicionado das culturas de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade entre as amostras ($p > 0,05$). 27

Figura 8. Atividade de proteases secretadas por 10^7 trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* de culturas recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Ensaio de zimografia realizado em gel de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina, em pH 7,2, usando meio condicionado por 10^7 trofozoítos mantidos a 37° C por 24 horas. 28

Figura 9. Percentagem de encistamento de culturas de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Às 72 horas, houve diferença significativa da percentagem de encistamento da amostra LP em relação às demais ($p < 0,05$). 29

Figura 10. Viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* de culturas recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**], após exposição da clorexidina a 0,02 % no período de 24 horas. As letras acima das barras 30

representam a significância estatística entre os valores de efeito citopático, sendo letras iguais sem diferença ($p > 0,05$) e letras distintas com diferença ($p < 0,05$).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentual
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ADP	Adenosina difosfato
ALX	Estirpe
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Coleção Americana de Culturas
ATP	Adenosina trifosfato
AVL	Ameba de Vida Livre
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CA	Ceratite Amebiana
cm²	Centímetro quadrado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGA	Encefalite Granulomatosa Amebiana
EUA	Estados Unidos da América
HEp-2	<i>Human Epidermoid carcinoma strain #2</i> , Estirpe de carcinoma epidérmico humano #2
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
kDa	Quilodalton
MBP	<i>Mannose-Binding Protein</i> , Proteína de Ligação Manose
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> , Linhagem Celular Originada de Células Renais de Cão
mg	Miligrama
MIP133	Proteína induzida por manose de 133 kDa
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>

nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
P2Y₂	Receptor purinérgico metabotrópico
PAGE	<i>Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis</i> , Gel de Eletroforese de Poliacrilamida
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHMB	Poli-hexametileno biguanida
PMSF	<i>Phenylmethane Sulfonyl Fluoride</i> , Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PYG	<i>Peptone, Yeast Extract and Glucose</i> , Peptona, Extrato de Levedura e Glicose
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Real Time-Polimerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Dodecacil Sulfato de Sódio
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
TRITON X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3.1. Geral.....	5
3.2. Específico.....	5
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
3.1. O gênero <i>Acanthamoeba</i>	7
3.2. Ceratite Amebiana.....	9
3.3. Fisiopatologia da Ceratite Amebiana.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Amostras de <i>Acanthamoeba</i>	18
4.2. Linhagem de cultura celular.....	18
4.3. Cultura de <i>Acanthamoeba</i> interagidas com MDCK.....	19
4.4. Avaliação de propriedades de patogenicidade.....	20
4.4.1. Efeito citopático.....	20
4.4.2. Efeito citotóxico.....	21
4.4.3. Zimografia.....	22
4.4.4. Indução de encistamento.....	22
4.4.5. Resistência a clorexidina.....	23
4.5. Estatística.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Recuperação e axenização de cultura estoque.....	25
5.2. Efeito citopático.....	26
5.3. Efeito citotóxico.....	27
5.4. Zimografia.....	28
5.5. Indução de encistamento.....	29
5.6. Resistência a clorexidina.....	30
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

As Amebas de Vida Livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* são protozoários encontrados em todos os ambientes do mundo, podendo resistir a extremas condições de temperatura e pH, bem como ao cloro e outros sistemas de desinfecção. Diversos trabalhos demonstram o isolamento do gênero *Acanthamoeba* em locais como água doce, águas minerais engarrafadas, água do mar, sedimentos de oceanos, água de rede pública de distribuição, águas industriais expostas a poluição, piscinas, lagos, rios, solo, ar, aparelhos de ar-condicionado, material de diálise, instrumental cirúrgico, lentes de contato e poeiras de hospital (DE JONKHEERE e VAN DE VOODE, 1977; DE JONKHEERE, 1991; FORONDA, 1979; GRIFFIN, 1977; SALAZAR, et al. 1982, VISVESVARA e STHIER-GREEN, 1990).

Acanthamoeba é reconhecidamente um protista oportunista que eventualmente pode causar a Ceratite Amebiana (CA), geralmente associada a usuários de lentes de contato imunocompetentes e a rara, porém geralmente fatal Encefalite Granulomatosa Amebiana (EGA), que tem maior prevalência em indivíduos imunocomprometidos (MORTAZAVI, et al. 2009; VERÍSSIMO, et al. 2013; ALSAM, et al. 2008; LORENZO-MORALES, et al. 2015).

Apesar de se tratar de um microrganismo relacionado a manifestações clínicas graves, seus mecanismos de patogenia não são totalmente conhecidos. Nesse sentido, há um espaço dos pesquisadores para compreender os fatores biológicos relacionados à capacidade do gênero *Acanthamoeba* causar uma infecção. Dado o crescente número de doentes e a ubiquidade da ameba em questão, entende-se a necessidade de compreender os mecanismos que levam este microrganismo a se tornar patogênico. É notório o aumento de estudos com *Acanthamoeba*, mas devido ao fato de ser um patógeno recentemente descoberto (1972), muito ainda precisa ser estudado. E uma das dificuldades é o número restrito de técnicas que possibilite a compreensão dos mecanismos de patogenicidade e virulência. Além de poucas técnicas, há falta de padronização o que dificulta a reprodutibilidade e comparação de resultados.

Um dos problemas que leva a dificuldade de interpretação dos resultados obtidos é a possibilidade do cultivo *in vitro* alterar as características dos isolados. Em vários organismos parasitos como *Leishmania sp.* e *Naegleria fowleri* é conhecido que o cultivo prolongado em condições axênicas leva à perda de características relacionadas a patogenicidade e que as mesmas podem ser recuperadas após passagem no hospedeiro ou em cultura celular (NOLAN & HERMAN, 1985; GRIMM et al, 1991; JOHN & JOHN, 1994). Em *Acanthamoeba*, isso também parece ocorrer, conforme demonstrado por escassos trabalhos que indicam que a passagem em animais de experimentação ou em cultura celular levam à recuperação de propriedades fisiológicas relacionadas à virulência de culturas axênicas (MAZUR & HADAS, 1994; KOEHLER, et al. 2009; VERISSIMO, et al. 2013). Assim, avaliar outros isolados de

Acanthamoeba quanto a perda e recuperação de aspectos de patogenicidade é importante para determinar se esse comportamento é uma característica do gênero.

Dessa forma, é importante que os procedimentos experimentais com amostras axênicas de *Acanthamoeba* levem em consideração a perda de propriedades fisiológicas por cultivo prolongado, buscando utilizar culturas recentes, não submetidas a numerosas passagens no cultivo.

Considerando esses aspectos, propõe-se nesse trabalho avaliar os parâmetros de virulência em um isolado mantido em cultura no Laboratório de Protozoologia por nove anos e compará-lo a cepa axenizada por igual período de tempo, permitindo elucidar que parâmetros sofreram modificações devido ao cultivo prolongado. Também avaliaremos esses dois isolados após a passagem em cultura de célula. Essa é uma estratégia *in vitro* de recuperação de virulência de *Acanthamoeba*, o que pode vir e evitar o uso de animais de experimentação.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar propriedades fisiológicas relacionadas à patogenicidade de amostra de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada e em cultivo axênico prolongado e o efeito da interação com células da linhagem MDCK nessas propriedades.

2.2. Específico

- a) Recuperar cistos da cultura original de *A. castellanii* obtida de raspado de córnea, mantida em estoque há nove anos e proceder à axenização da amostra.
- b) Comparar a cultura axênica de longo período (repicada sucessivamente por nove anos) com a cultura recém-axenizada em relação às seguintes propriedades de patogenicidade:
 - Efeito citopático em células MDCK;
 - Efeito citotóxico em células MDCK;
 - Atividade de proteases secretadas;
 - Taxa de encistamento;
 - Resistência a clorexidina;
- c) Avaliar o efeito da interação dos trofozoítos com células MDCK nas propriedades de patogenicidade, comparando as culturas de longo período e recém axenizadas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O gênero *Acanthamoeba*

As amebas do gênero *Acanthamoeba* foram primeiramente observadas em 1930, quando Castellani descobriu um protozoário que contaminava uma cultura de *Cryptococcus pararoseus* e deu a ele o nome de *Hartmannella castellanii*. Um ano depois, Volkonsky subdividiu o gênero *Hartmannella* em três, com base em características morfológicas, de locomoção e da aparência do cisto, de maneira que a ameba descoberta por Castellani passou a se chamar *Acanthamoeba castellanii* (KHAN, 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008). O prefixo *Acanth* (“espinhos” em Grego) foi adicionado ao termo “amoeba” para indicar a presença de estruturas semelhantes a espinhos, conhecidas como acantopódios, na superfície desses organismos (KHAN, 2006).

Após a descoberta, esses organismos foram ignorados por três décadas. No entanto, no final dos anos 50, durante procedimentos para fabricação da vacina da poliomielite, foi observado *Acanthamoeba culbertsoni* como contaminante de cultura celular. Amostras desse contaminante foram inoculadas em ratos e macacos que, após uma semana vieram a óbito por conta de uma encefalite. Nas lesões dos animais e nas culturas feitas, foram isolados trofozoítos e cistos da ameba. A partir deste resultado, propôs-se que infecções semelhantes poderiam ocorrer em humanos (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

Em 1972, houve o primeiro relato de EGA em seres humanos. Os primeiros casos de CA começaram a ser relatados em 1974. Desde então, houve um crescente interesse pela pesquisa deste microrganismo (KHAN, 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

As espécies que compõem o gênero *Acanthamoeba* possuem, em seu ciclo de vida, duas fases evolutivas, trofozoíto e cisto.

O trofozoíto é a fase ativa em seu ciclo e possui um tamanho que varia entre 15 a 45 µm de diâmetro. Seu citoplasma é granuloso, apresenta um ou mais vacúolos contráteis e apenas um único núcleo grande e denso. Possui projeções protoplasmáticas que caracterizam o gênero, denominados acantopódios, cuja finalidade é a de aderir a superfícies, se locomover e capturar alimento (**Figura 1. A**). Alimentam-se de bactérias, algas, leveduras e matéria orgânica. A reprodução é assexuada por divisão binária (CLARKE & NIEDERKORN, 2006; LLOYD, 2014).

Quando o meio em que o trofozoíto se encontra é desfavorável, por conta da falta de alimento, variação brusca de temperatura, osmolaridade ou pH, inicia-se o processo de encistamento. Na fase cística, a ameba pode resistir a variadas condições extremas que outrora

eram agressivas a fase trofozoítica. Neste momento a ameba é capaz de suportar variadas condições físicas como radiação gama e radiação ultravioleta, altas temperaturas, congelamento em nitrogênio líquido, além da resistência química a desinfetantes e antimicrobianos (CLARKE & NIEDERKORN, 2006).

Os cistos, por sua vez, variam de 12 a 25 μm de diâmetro, tendo uma parede dupla sendo a interna denominada endocisto e a externa denominada ectocisto. Ainda há muitas discordâncias sobre a composição da parede dupla. No que se refere à espessura de cada parte da parede, estudos de fratura por congelamento indicam, a partir da visualização em microscopia eletrônica, que o ectocisto é mais grosso que endocisto, possui superfície irregular e vesículas em seu interior. Além disso, a parede dupla possui junções de número variado entre o endocisto e ectocisto chamadas poros ou ostíolos que, em condições ambientais favoráveis, propicia a liberação do trofozoíto, processo denominado desencistamento (CLARKE & NIEDERKORN, 2006; FOUQUE, et al. 2012).

Por vezes, é possível encontrar bactérias viáveis no interior de cistos e trofozoítos, sendo esta condição uma forma de dispersão não só da ameba como das bactérias viáveis. (FOUQUE, et al. 2012).

Devido à dificuldade de classificação das espécies do gênero *Acanthamoeba*, Pussard e Pons (1977) propuseram três subgrupos morfológicos (I, II e III) com base no tamanho e formato dos cistos:

- **Grupo I:** As espécies do grupo morfológico I possuem cistos maiores ($\geq 18 \mu\text{m}$ de diâmetro), quando comparadas a outros grupos, sendo que seu ectocisto é liso e seu endocisto é rugoso, semelhante a uma estrela (**Figura 1.B**).
- **Grupo II:** As espécies do grupo morfológico II, que possuem o maior número de representantes, caracterizam-se como cistos de diâmetro médio (próximo a $18 \mu\text{m}$ de diâmetro), tendo um ectocisto enrugado e um endocisto estrelado, poligonal ou triangular (**Figura 1.C**).
- **Grupo III:** As espécies do grupo morfológico III apresentam um tamanho pequeno ($\leq 18 \mu\text{m}$ de diâmetro), um ectocisto e endocisto fino, liso e com formato esférico (**Figura 1.D**).

Contudo, com o advento da biologia molecular, a classificação do gênero *Acanthamoeba* se tornou mais robusto. Baseando-se no DNA ribossomal 18S, foi possível classificar 20 genótipos, denominados de T1 a T20. Os genótipos T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11, T15, T18 e T20 foram relacionados a casos infecciosos, sendo T4 o genótipo mais

frequentemente relacionado as doenças (PUMIDONMING, et al. 2014; MAGNET, et al. 2014; FUERST, et al. 2015).

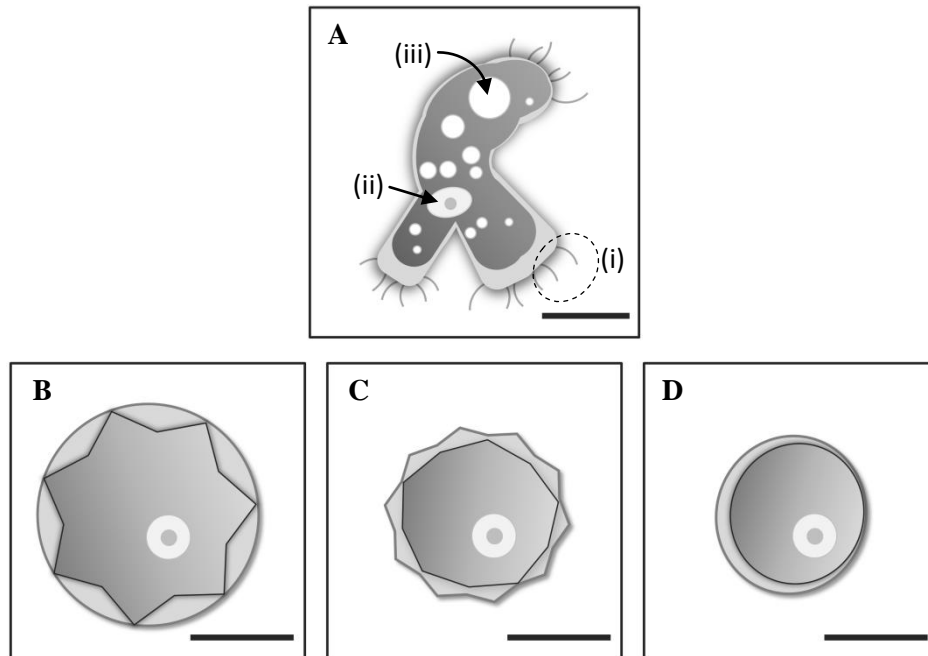


Figura 1. Esquema das fases evolutivas do gênero *Acanthamoeba*. **A)** Fase trofozoítica em microscopia de contraste de fase, evidenciando-se (i) acantopódios, (ii) núcleo e (iii) vacúolo; **B)** Fase cística de grupo morfológico I; **C)** Fase cística de grupo morfológico II; **D)** Fase cística de grupo morfológico III. Escala da barra: 10 μ m. (Fonte: Arquivo pessoal)

3.2. Ceratite Amebiana

Dentre as manifestações causadas pelo gênero *Acanthamoeba*, a CA tem se tornado a mais comum delas devido ao crescente uso de lentes de contato (SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; LORENZO-MORALES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013). Contudo, para compreensão da patogenia da CA, é preciso entender as particularidades e composição histológica da córnea (GRAY, et al. 2010).

Infecções que acometem os olhos são únicas, pois o órgão é extremamente delicado, sendo o segundo mais exposto ao meio externo. O olho é subdividido em vários tipos de tecido muito distintos, de modo que inflamações e infecções se apresentam de maneira diferente a cada uma delas. No que se refere a córnea, as inflamações e infecções podem ocasionar sequelas, já

que estes agentes ocasionam a opacidade do tecido e consequente diminuição da capacidade de enxergar (GRAY, et al. 2010).

A córnea é um tecido transparente, com formato convexo, de posição anterior central. Cobre a íris e a pupila, formando a câmara anterior. Tem a função de refletir a luz para dentro do olho tendo a responsabilidade sobre dois terços da acuidade visual.

A córnea é subdividida em camadas de características próprias. A primeira delas é o epitélio, localizando-se mais externamente à córnea, caracteriza-se por ser escamoso, estratificado e não-queratinizado. É composto por cinco a seis camadas de célula ($\approx 50\text{-}100\ \mu\text{m}^3$ de espessura). O epitélio é lavado constantemente pelo filme lacrimal que mantém a superfície lisa para uma boa refração da luz, dilui substâncias nocivas ao olho, além de fornecer O_2 e IgA para o epitélio.

A membrana basal é composta por células capazes de realizar mitose que, em certo momento, passam a fazer parte da composição do epitélio. Toda essa composição é seguida pela membrana de Bowman, uma película transparente feita de fibras de colágeno e proteoglicanos de caráter altamente resistente. Logo após vem o estroma, reconhecidamente sendo a camada mais espessa da córnea. O estroma é composto por fibras de colágeno e algumas poucas células. O arranjo das fibras de colágeno é essencial para a transparência condutora de luz.

A membrana de Descemet é uma fina película que divide o estroma do endotélio. O endotélio é uma monocamada de células disposta em padrão mosaico sendo a última camada da córnea. Recebe oxigênio pelo humor aquoso tendo como principal função servir como uma bomba de água para hidratação das camadas superiores da córnea (**Figura 2**).

A complexidade que o tecido da córnea possui permite perceber as variadas ferramentas que a ameba precisa portar para que ela seja capaz de gerar a CA e, consequentemente, o prejuízo à córnea e a visão do hospedeiro.

A CA representa uma infecção progressiva da córnea caracterizada por dor intensa, vermelhidão da conjuntiva, edema, sensação de corpo estranho, fotofobia e lacrimejamento (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; KINNEAR, et al. 2004; LORENZO-MORALES, et al., 2015; CARNT, et al. 2016).

No início da infecção, uma ceratopatia difusa superficial, com provável origem em fatores imunológicos, é observada. Na fase precoce da ceratopatia, são descritos achados biomicroscópicos que são pequenas lesões epiteliais e edema microcístico. Durante o processo inflamatório, alterações epiteliais tornam-se mais evidentes podendo evidenciar pseudodentrito,

ceratite ponteadada ou defeito epitelial verdadeiro. Tu e colaboradores (2009) estabelecem cinco níveis da gravidade da CA com base em achados oftalmológicos:

1. Epitelite: pequena inflamação resultando em opacidade branca e granular da camada epitelial, sem alcançar o estroma;
2. Epitelite com neurite radial: epitélio com aparência irregular e nervo corneal inflamado podendo gerar necrose;
3. Doença estromal anterior: ocorre quando o agente infeccioso alcança a primeira porção do estroma. Neste momento é possível observar infiltrados subepiteliais ou úlceras não necróticas superficiais bem delimitadas;
4. Ceratite estromal profunda: ocorre quando o agente infeccioso alcança porções mais profundas do estroma. Neste momento o infiltrado se torna difuso;
5. Infiltrado anelar: formação de um anel opaco sobre o infiltrado difuso;

Manifestações inflamatórias extra córnea, como o acúmulo de exsudado em todo o limbo e conjuntivite são identificadas em fases precoces e tardias da CA (limbite).

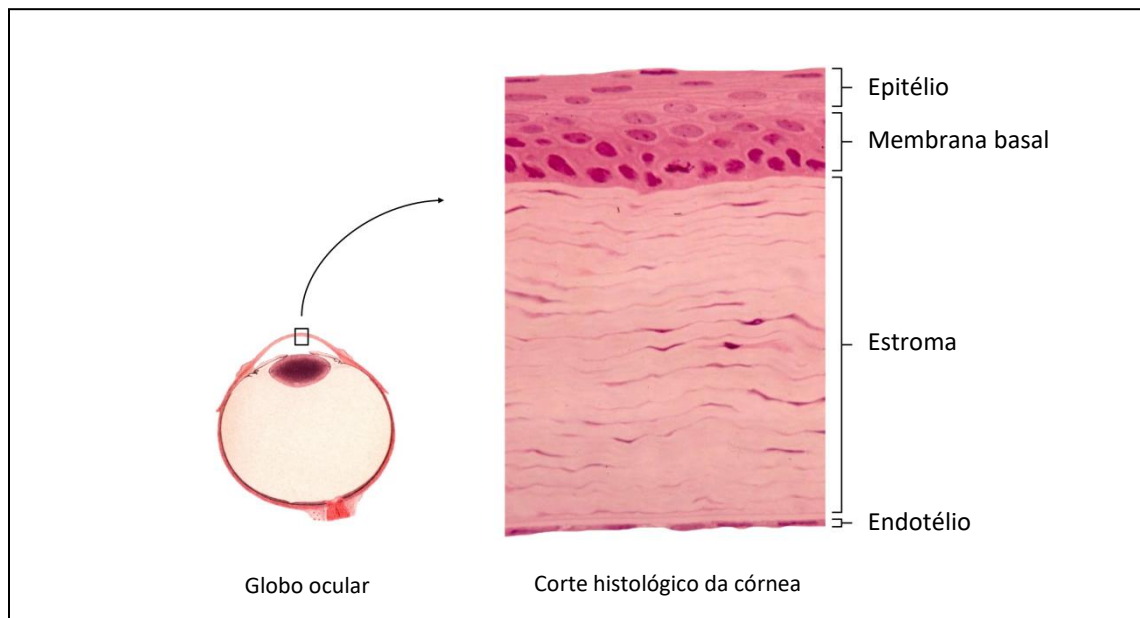


Figura 2. Aspecto histológico da córnea discriminando quatro camadas de células. (Fonte: Figura adaptada do Laboratório de Histologia da *Universidad Nacional Autónoma de Honduras*, 2014).

Percebe-se, portanto, que o diagnóstico clínico da CA é desafiador, pois, as manifestações patológicas iniciais são facilmente confundidas com infecções por herpes simples enquanto que em fases mais avançadas, a infecção se assemelha a um quadro clínico de ceratite fúngica ou outros tipos de úlcera na córnea. Hoje diversas técnicas para diagnóstico laboratorial estão bem estabelecidas como a microscopia confocal, a PCR, a RT-PCR e a sorologia por detecção de anti-acanthamoeba, contudo a técnica padrão ouro é a detecção direta de cistos ou trofozoítos a partir da raspagem da córnea (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008; LORENZO-MORALES, et al. 2015).

Para o tratamento da CA, faz-se uso da associação de antimicrobianos num período que varia de meses até anos. As principais associações medicamentosas são entre uma Biguanida e uma Diamidina aromática, sendo os mais utilizados das Biguanidas, o Poli-hexametileno biguanida (PHMB) a 0,02%, que é tóxico para células da córnea mesmo em baixas concentrações, e a Clorexidina 0,02%, que é eficaz contra ambas as formas evolutivas não sendo tóxicas para células da córnea em concentrações baixas. A Diamidina aromática mais utilizada é o Isotionato de propamidina 0,1% (Bronele®). Outros medicamentos também são comumente usados como coadjuvantes como os antifúngicos tópicos (miconazol a 1%, clotrimazol 1-2%) ou sistêmicos (ketoconazol e itraconazol). O uso de corticoides não é recomendado, pois, apesar de ensaios in vitro constatarem a inibição da formação do cisto, quando em ensaios clínicos, não foi possível verificar benefícios a melhora clínica, tendo sido associado à falha no tratamento (ALVARENGA, et al. 2000; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008; LORENZO-MORALES, et al. 2015).

Durante o processo de tratamento, os pacientes devem ser monitorados, pois é comum a recidiva da doença por falhas no tratamento que podem ser ocasionadas por (i) pouca penetração do fármaco, (ii) duração insuficiente do tratamento ou (iii) resistência adquirida ao fármaco (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Contudo, por causa do difícil diagnóstico, o tratamento da CA, na maior parte das vezes, inicia-se tardiamente. Neste período a doença chega ao terceiro nível, resultando em algum tipo de lesão irreversível da córnea e comprometendo a acuidade visual. Em casos extremos, a linha de tratamento recomendada é a ceratoplastia (transplante de córnea) ou a retirada completa do globo ocular (ALVARENGA, et al. 2000; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; CLARKE & NIEDERKORN, 2006; YOKOGAWA, et al. 2012).

O principal fator de risco para o desenvolvimento da CA é o crescente uso de lentes de contato desde a década de 80 (SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; LORENZO-MORALES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013). A má higienização das lentes permite a colonização da ameba que, associada ao uso prolongado do acessório, causa lesões à córnea dando

oportunidade para ameba se aderir e iniciar o processo infeccioso na córnea (STOPAK, et al. 1991; MUTOH, et al. 2010). As ocorrências não relacionadas ao uso de lentes de contato perfazem 7-15% do total de casos. Nestes, a infecção acontece pela lesão acidental da córnea com materiais sólidos contaminados com amebas (STOPAK, et al. 1991; ILLINGWORTH & COOK, 1998; ABBOT & ELANDER, 1995; SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; CARNT, et al. 2016).

A CA é considerada uma doença rara tendo prevalência estimada de 1-9/100.000. No final de 1990, a incidência de CA foi estimada em um a dois casos por milhão de usuários de lentes de contato nos EUA. Na Holanda, três casos por milhão de usuários de lentes de contato. Em 2002, houve uma elevada incidência desta doença no Reino Unido atribuída a utilização de tanques como uma fonte de água doméstica, tendo entre 17 e 21 casos relacionados ao uso de lentes de contato por milhão de pessoas. Na Índia, a CA não está relacionada às lentes de contato, geralmente os casos ocorrem após trauma ocular ou exposição à água contaminada (CLARKE & NIEDERKORN, 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

A única pesquisa epidemiológica da CA realizada no Brasil foi feita no estado de São Paulo no período de 1987 a 2006. Durante esse período a Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo recebeu 581 pacientes suspeitos, dos quais 185 obtiveram diagnóstico para CA. Dos pacientes diagnosticados com CA, 83% eram usuários de lentes de contato. Foi identificado ainda um progressivo aumento do número de casos de CA conforme o passar dos anos, possivelmente isso se deve ao crescente número de adeptos ao uso de lentes de contato no país (CARVALHO, et al. 2009).

Portanto, a profilaxia da CA se dá pela educação dos usuários de lentes de contato: (i) as lentes de contato e suas caixas devem ser limpas e armazenadas utilizando sistema apropriado de limpeza; (ii) tanto as lentes quanto suas caixas, devem ser trocadas regularmente; (iii) não usar lentes de contato ao se banhar em lagos, lagoas, rios, mar banheira de hidromassagem ou jacuzzi; (iv) não usar lentes de contato ao praticar esportes aquáticos (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008; LORENZO-MORALES, et al. 2015)

3.3. Fisiopatologia da Ceratite Amebiana

As amebas do gênero *Acanthamoeba* vivem como microrganismos de vida livre na natureza, contudo, ocasionalmente têm a capacidade de invadir um hospedeiro transformando-se num parasito. Para que essa transição ocorra, uma série de fatores complexos e ainda pouco

conhecidos precisam ocorrer (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2006).

Quando a ameba entra em contato com a córnea, é necessário que haja adesão do trofozoíto à superfície epitelial. Para dar início ao processo infeccioso, dois fatores são essenciais: (i) expressão de adesinas na superfície da ameba, como a Proteína de Ligação Manose (MBP), que adere às glicoproteínas de manose da superfície celular do hospedeiro (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008). Para além da adesão, tais proteínas contribuem para formação de aglomerados de amebas aumentando o número do agente infeccioso num mesmo ponto. Há também a importante influência dos (ii) acantapódios presentes na fase trofozoítica por modularem a ligação entre superfícies biológicas. Por isso, quando maior o número de acantapódios, maior será a capacidade de adesão (LORENZO-MORALES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013; LORENZO-MORALES, et al. 2015)

Essa forte adesão de *Acanthamoeba* ao tecido epitelial da córnea conduz a um processo secundário de fagocitose com auxílio de fosfolipases. Esse fenômeno consiste na internalização de grandes partículas (ou, até mesmo, células inteiras), por intermédio de pseudopodes, formando fagossomos que logo são digeridos por um metabolismo oxidativo. Neste momento há abertura de poros à membrana da célula alvo, gerando desequilíbrio osmótico e morte celular do hospedeiro. Durante todo o processo fisiopatológico, restos celulares são formados sendo estes fagocitados pela ameba. (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES, et al. 2015).

Com o processo infeccioso instaurado as ecto-ATPases, glicoproteínas expressas na membrana plasmática, hidrolizam ATP extracelular em ADP que se liga a receptores purinérgicos P2Y₂, resultando no aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular na célula alvo. Este fenômeno induz alterações no citoesqueleto e a ativação da caspase-3, conduzindo a apoptose da célula hospedeira. A ecto-ATPase também inibe a ação da suramina, um fármaco antagonista do receptor purino P2 que, em outros parasitos, inibe a síntese de DNA, a atividade da topoisomerase e a transcriptase reversa retroviral, garantindo uma sobrevida do parasito. Sendo assim, dentro dos fatores relacionados a virulência de *Acanthamoeba*, esta glicoproteína atua tanto por vias dependentes quanto independentes de contato (MATTANA, et al. 2001; KHAN, 2006; SIDDIQUI & KAHN, 2012; CASTRILLÓN, et al. 2013).

Acanthamoeba ainda exerce sua ação patogênica ao bloquear genes importantes no processo de divisão celular do hospedeiro, impedindo a regeneração do tecido (LORENZO-MORALES, et al. 2015).

Por quimiotaxia, a ameba é conduzida para camadas mais profundas do epitélio da córnea em direção ao endotélio. A literatura indica uma relação entre casos persistentes de CA e

a visualização, por microscopia confocal, de cistos de *Acanthamoeba* aderidos à membrana de Bowman (YOKOGAWA, et al. 2012).

Em outros casos as amebas não encistam e continuam a digestão de camadas mais profundas, perfurando a membrana de Bowman e alcançando o estroma. Por conta da composição proteica característica do estroma, enzimas proteolíticas como a metalo-protease, serino-protease, cisteíno-protease e elastase são liberadas. A liberação de proteases ocorre devido a interação intercelular pela ligação da manose a célula alvo (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; KIM, et al. 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

Acanthamoeba faz uso das proteases a fim de catalisar a hidrólise total de proteínas que servirão de alimento e permitem a sua invasão no tecido do hospedeiro. Por conta disso, acredita-se hoje que um dos principais fatores relacionados à virulência de uma estirpe está relacionado à quantidade e atividade de proteases extracelulares (LORENZO-MORALES, et al. 2015).

A metalo-protease tem por finalidade a degradação da membrana basal e componentes da matriz extracelular, tais como colágeno do tipo I (tipo de colágeno mais comum encontrado na córnea), colágeno do tipo II, colágeno do tipo III, elastina (fibrina da matriz extracelular), fibronectinas e laminina (glicoproteína essencial para adesão celular e formação da matriz extracelular) (KHAN, 2006).

Ao alcançar o estroma, que ocupa cerca de 90% de toda espessura da córnea, as metalo-proteases ativadas por *Acanthamoeba* clivam plasminogênio, presente nas células do hospedeiro, para formar plasmina, uma serino-protease (LORENZO-MORALES, et al. 2015). Outras serino-protease e cisteíno-proteases são liberadas com a finalidade de agir sobre o estroma. É neste estágio da doença que é possível observar a lesão característica da CA com a formação do anel turvo no estroma devido à resposta inflamatória, edema e necrose.

A cisteíno-protease possui um papel fundamental na hidrólise de hemoglobina ao invadir células sanguíneas e é um importante componente no processo de encistamento da *Acanthamoeba* sob condições adversas (KOEHSLER, et al. 2009)

Em estudo realizado, Siddiqui & Khan (2012) relataram que, das três classes de proteases, as serino-proteases são as mais importantes delas, ao observarem que o efeito citotóxico diminuiu quando uma cultura contendo amebas e células hospedeiras entraram em contato com fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) que inibe a ação dessa classe de proteases. Esta observação foi confirmada após utilização da técnica de silenciamento dos genes relacionados à serino-protease. Hurt e colaboradores (2003) demonstraram que a serino-protease

induzida por manose, com peso de 133 kDa (MIP-133), está associada a patogenicidade de *Acanthamoeba*.

As serino-proteases são capazes de degradar colágeno, fibronectina, laminina, IgA, IgG, inibidores de protease, quimiocinas, citocinas, plasminogêneo, fibrinogênio, fibrina, albumina e hemoglobina. Sendo importante destacar sua ação sobre o colágeno do tipo I, principal componente do estroma da córnea e sobre a imunoglobulina A, encontrada nas lágrimas. A MIP133, serino-protease mais descrita na literatura, tem mostrado relação com a degradação de ceratócitos, células epiteliais do pigmento da retina, células epiteliais e endotélis da córnea e induzir a apoptose de células do sistema monofagocitário como o macrófago (CLARKE & NIEDERKORN, 2006).

Tendo em vista tudo o que foi exposto, percebe-se a necessidade da coexistência de diferentes características e mecanismos de uma estirpe para gerar a CA, sendo estes dependentes ou independentes de contato. Ou seja, *Acanthamoeba* não depende apenas de uma variável para caracterizar-se como virulenta. O mecanismo dependente de contato está relacionado à interação intercelular e o mecanismo independente de contato envolve a degradação de componentes da matriz extracelular (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SIDDIQUI & KHAN, 2012; LORENZO-MORALES, et al. 2015; CHÁVEZ-MUNGUÍA, et al. 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de *Acanthamoeba*

No ano de 2007, um paciente foi encaminhado ao Laboratório de Protozoologia da UFES pelo Ambulatório de Oftalmologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM-UFES), sendo este diagnosticado com CA causada pela espécie *Acanthamoeba castellanii* (Genótipo T4). Este diagnóstico foi feito a partir de um raspado de córnea que fora cultivado em ágar soja, um meio de cultivo sólido contendo *Escherichia coli* (COSTA, et al. 2010), e a estirpe recebeu a denominação ALX. No ano de isolamento, a cultura ALX foi submetida ao processo de axenização em meio PYG (Peptone, Yeast Extract and Glucose) (VISVESVARA & BALAMUTH, 1975), sendo mantida por repiques sucessivos.

Essa cultura axênica mantida em repiques sucessivos por nove anos foi utilizada neste trabalho, recebendo a denominação de **LP (Longo Período)**.

Uma segunda cultura usada nesse trabalho foi submetida ao processo de axenização em novembro de 2015. Para isso, cistos da cultura estoque original em ágar soja, obtida do isolamento a partir do raspado de córnea em 2007, foram raspados da superfície do meio e transferidos a uma nova placa de ágar soja contendo *E. coli*. Após multiplicação dos trofozoítos e encistamento, os cistos foram removidos da placa por lavagem com salina de Page (2,5 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 0,5 mM Na₂HPO₄, 40 mM CaCl₂.6H₂O e 20 mM MgSO₄.7H₂O) e submetidos a axenização, conforme Costa e colaboradores (2010).

O procedimento de axenização consistiu em lavar os cistos por 3 vezes por meio de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos em salina de Page e trata-los com 625 µg/mL de enrofloxacino (Baytril®) (volume final 5 mL) *overnight* a temperatura ambiente. Após nova lavagem para remoção do antibiótico, os cistos foram inoculados em meio PYG suplementado com 10% de soro bovino fetal (ROWBOTHAM, 1980) e contendo o antibiótico enrofloxacino (Baytril®) na concentração de 5 µg/mL. O tubo foi incubado à temperatura de 28 °C em estufa microbiológica. Essa cultura foi denominada **RA (Recém Axenizada)**.

4.2. Linhagem de cultura celular

O presente estudo fez uso da linhagem celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney), células epiteliais em monocamada de rins de cão, com origem no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, ATCC: CCL-34).

As células MDCK foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (Garamicina e Anfotericina B). A cultura foi mantida em estufa exclusiva a 37°C com 5% de CO₂ (GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013).

Para garantia da preservação das células, parte da linhagem adquirida foi criopreservada em freezer -80°C utilizando recipientes do tipo contêiner (NalgenfTM) contendo isopropanol.

A escolha da MDCK é justificada por se tratar de uma linhagem epitelial, ou seja, de crescimento confluyente. Por isso, é possível observar a abrangência de destruição causada. Essa compreensão vem como reflexo da prática realizada em outros trabalhos que também utilizam a MDCK como modelo experimental, garantindo uma confiabilidade e reprodutibilidade nos resultados (GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2006; GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013; CHÁVEZ-MUNGUÍA, et al. 2016). As células foram usadas tanto para obter culturas de amebas interagidas, visando avaliação de recuperação de patogenicidade, quanto para avaliação de efeito citopático e citotóxico, conforme itens posteriores.

4.3. Culturas de *Acanthamoeba* interagidas com MDCK

As culturas **LP** e **RA** foram submetidas a um processo de interação com células MDCK e após recuperação dos trofozoítos, as culturas resultantes foram denominadas **LP (3x)** e **RA (3x)**.

Para a interação, 10⁷ trofozoítos das amostras **LP** e **RA** foram postos em a uma garrafa de 75 cm² contendo uma monocamada de MDCK em um intervalo de 24 horas, a 37° C. Ao final deste período, todo conteúdo da garrafa foi coletado e centrifugado, o sobrenadante, descartado e o corpo de fundo, transferido para uma nova garrafa contendo MDCK. Passadas outras 24 horas, esse procedimento foi repetido por mais uma vez, totalizando três passagens. Ao final do processo de interação as culturas **LP (3x)** e **RA (3x)** foram mantidas em garrafas de 75 cm² contendo cerca de 10 mL meio líquido enriquecido, PYG, renovado a cada 48 horas baseando-se na fase logarítmica de crescimento das culturas a 28 °C.

Na **Figura 3** está esquematizado o histórico de cada amostra usada nesse trabalho, que envolveu, portanto, culturas de longo período e recém axenizadas, ambas estudadas antes e após interação com células MDCK.

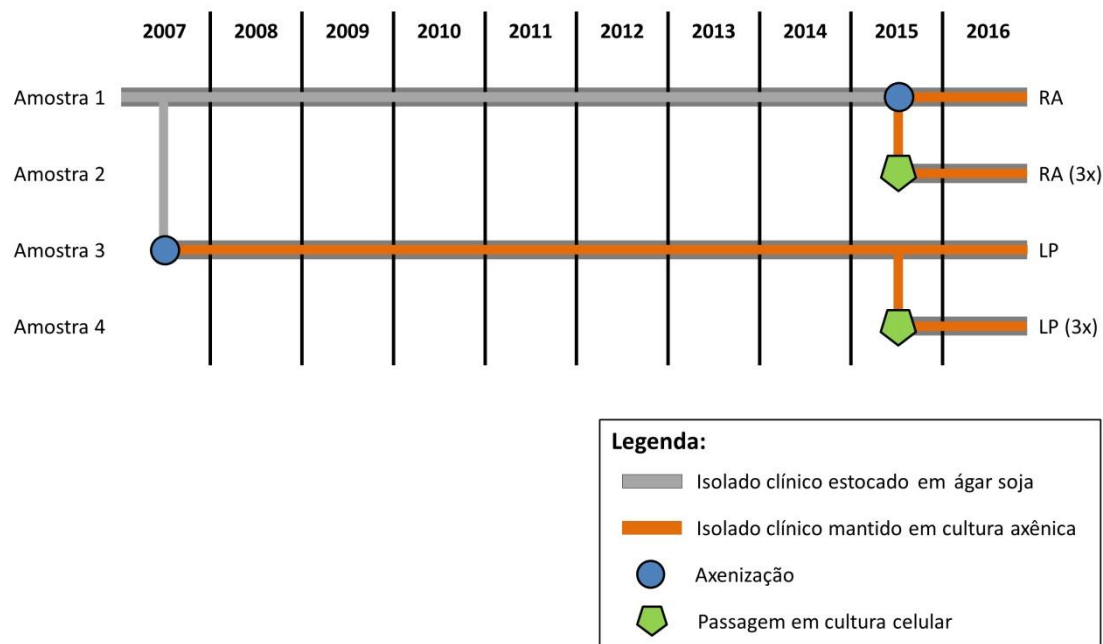


Figura 3. Infográfico que identifica o histórico por trás de cada amostra utilizada. Raspado de córnea de paciente com CA realizado, cultivado e estocado em ágar soja no ano de 2007. **Amostra 1:** axenização e cultivo em PYG realizados em 2015, denominando-se **RA**; **Amostra 2:** interação de **RA** com a monocamada de células da linhagem MDCK, denominando-se **RA (3x)**; **Amostra 3:** amostra axenizada em 2007 e cultivada em PYG até o ano 2016, denominando-se **LP**; **Amostra 4:** interação de **LP** com a monocamada de células da linhagem MDCK, denominando-se **LP (3x)**.

4.4. Avaliação de propriedades de patogenicidade

4.4.1. Efeito citopático

Células da linhagem MDCK foram tripsinizadas, subcultivadas em placa de 24 poços e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Após a formação da monocamada, trofozoítos das amostras LP, RA, LP (3x) e RA (3x) foram postos junto à cultura de células (GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2013; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013).

A patogenicidade foi definida pela ação da ameba na monocamada de células MDCK dentro de 24 horas. Neste intervalo de tempo, espera-se que ocorra a formação de alos de destruição de tamanhos variados. Para melhor visualização destes alos, fez-se uso do corante cristal violeta (WALOCHNIK, et al. 2000; KHAN, et al. 2000; GONZÁLEZ-ROBLES, et al.

2006; GONZÁLEZ-ROBLES, et al. 2013). Os halos formados foram medidos para mensuração do efeito citopático e um gráfico foi gerado a partir do programa GraphPad Prism 7.

4.4.2. Efeito citotóxico

Para avaliação de efeito citotóxico, o meio condicionado de *Acanthamoeba* foi usado para interação com células MDCK. É denominado meio condicionado o meio de cultura líquido (PYG) contendo componentes secretados por *Acanthamoeba*. Para produção do meio condicionado, garrafas contendo a cultura de *Acanthamoeba*, em crescimento logarítmico, foram deixadas em banho de gelo e mantidas ali por 20 minutos, havendo assim o destacamento das amebas aderidas ao fundo da garrafa. A suspensão foi transferida para um tubo tipo falcon, e as amebas quantificadas em Câmara de Neubauer. Uma quantidade de 10^7 trofozoítos foi transferida para garrafa de 25 cm², com 5 mL de meio PYG fresco, incubada a 37° C por 24 horas.

O conteúdo da garrafa foi então transferido para tubo e centrifugado a 2.500 rpm por 10 minutos. Um volume de 3 mL do sobrenadante foi retirado e filtrado em uma membrana de 0,22 µm estéril (Kasvi) para garantir que não haja a passagem de trofozoítos para o meio condicionado. Os 3 mL filtrados foram distribuídos em eppendorfs contendo 100 µL cada e congelados no freezer -80°C (SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; OMAÑA-MOLINA, et al. 2013).

Para este experimento de efeito citotóxico, 4×10^4 células MDCK em 200 µL de DMEM foram cultivadas em placa de 96 poços. Após 24 horas, houve formação da monocamada, o DMEM antigo foi retirado e foram acrescentados 100 µL de DMEM novo e 100 µL do meio condicionado em cada poço. Como controle, poços contendo MDCK não foram expostos ao meio condicionado, tendo como meio de cultivo 100 µL de DMEM com 100 µL PYG.

Passadas outras 24 horas de exposição ao meio condicionado, 10 µL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (M6494 - Life Tech) foram adicionado em cada poço e a placa foi reincubada por mais 3,5 horas. Neste intervalo as células viáveis metabolizaram o MTT, transformando-o em sal de formazan que fica aderido ao fundo do poço.

Todo líquido de cada poço foi retirado e o sal de formazan foi dissolvido pela adição de DMSO gerando uma coloração violeta de intensidade proporcional à viabilidade das células MDCK. Para homogeneizar, fez-se uso de shaker por 5 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância da placa em ELISA tendo como comprimento de onda de 540 nm e referência de 620 nm (KUPCSIK, 2011; FRESHNEY, 2005).

Os cálculos para determinar o efeito citotóxico foram realizados a partir dos dados de absorbância do controle, considerando-o com 100% de viabilidade em relação a amostra teste. O efeito citotóxico foi considerado como a porcentagem de perda de viabilidade em relação ao controle. Todo este processo foi repetido por três vezes em datas distintas. Gráficos foram gerados a partir destes dados utilizando o programa GraphPad Prism 7.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Amostra} - \text{Branco}}{\text{Controle}} \times 100\%$$

4.4.3. Zimografia

Este ensaio foi feito por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10% copolimerizado com gelatina a 1 mg/mL, a 4°C. Cada amostra de meio condicionado, produzido conforme item 4.4.2, foi aplicado na proporção 1:2 com tampão de corrida. Para caracterizar parcialmente a natureza das proteases, uma alíquota de cada meio condicionado foi também incubada com inibidores de proteases, por 30 minutos em temperatura ambiente, antes de ser aplicada ao gel. Os inibidores utilizados foram EDTA (10 mM), que inibe metalo-proteases, e PMSF (1 mM), que inibe serino-proteases.

Ao fim dos 30 minutos, foram colocadas 5 µL de cada diluição nas canaletas do gel de zimograma. A corrida eletroforética durou 2 horas em refrigerador (4°C) (HURT, et al. 2003; KOEHLER, et al. 2009; SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; SANT'ANA, et al. 2014).

Terminada a corrida, as proteínas foram re-naturadas em solução de Triton X-100 (2%) por 30 minutos, duas vezes, sob agitação. O gel foi incubado em tampão tris 50 mM com CaCl₂ a 10 mM, pH 7,4 a 37°C, overnight (KHAN, et al. 2000; SOUZA-CARVALHO, et al. 2011).

Para visualização das bandas formadas pela corrida, o gel foi corado com Azul de Coomassie. Esse corante evidencia a região no gel onde houve a digestão feita pelas enzimas. (KHAN, et al. 2000; HURT, et al. 2003; SOUZA-CARVALHO, et al. 2011; SANT'ANA, et al. 2014).

4.4.4. Indução de encistamento

Os trofozoítos ($5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) de cada cultura foram transferidos para eppendorfs e induzidos ao encistamento utilizando o meio tamponado de Neff (95 mM NaCl, 5 mM KCl, 8

mM MgSO₄, 0,4 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃ e 20 mM Tris-HCl, pH 9) em temperatura ambiente. A quantificação dos cistos foi feita em 24, 48 e 72 horas utilizando Câmara de Neubauer (KOEHLER, et al. 2009).

4.4.5. Resistência a clorexidina

Foram distribuídos em placa de 96 poços, 4×10^4 trofozoítos em 100 µL de PYG e expostos a uma solução de 0,01µL de clorexidina em 100 µL de PYG por poço (concentração final de 0,02 %). Após 24 horas, 10 µL de MTT foram distribuídos em cada poço e a placa foi reincubada por mais 3,5 horas. Findo este período, a placa foi lida em leitor de ELISA iMark™ (Bio Rad) com absorvância de 540 nm por 620 nm de referência.

A viabilidade dos trofozoítos foi calculada e gráficos foram gerados a partir destes dados utilizando o programa GraphPad Prism 7. Todo experimento foi feito em triplicata.

4.5. Estatística

Para cálculos estatísticos dos experimentos supracitados, utilizou-se o programa IBM SPSS Statistics 22.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram realizadas comparações pareadas entre as amostras **LP** e **RA**, antes e após interação com células MDCK utilizando do teste *t*.

5. RESULTADOS

5.1. Recuperação e axenização de cultura estoque

A cultura estoque da estirpe ALX mantida em ágar soja desde 2007 manteve a viabilidade das formas císticas, pois foi possível realizar a passagem para outra placa de cultivo, o que resultou em multiplicação intensa dos trofozoítos e novo encistamento.

O processo de axenização a partir dos cistos resultou em presença de trofozoítos no meio PYG a partir do 7º dia de axenização. Após sete dias, puderam ser realizados repiques com observação de crescimento constante dos trofozoítos (**Figura 4**).

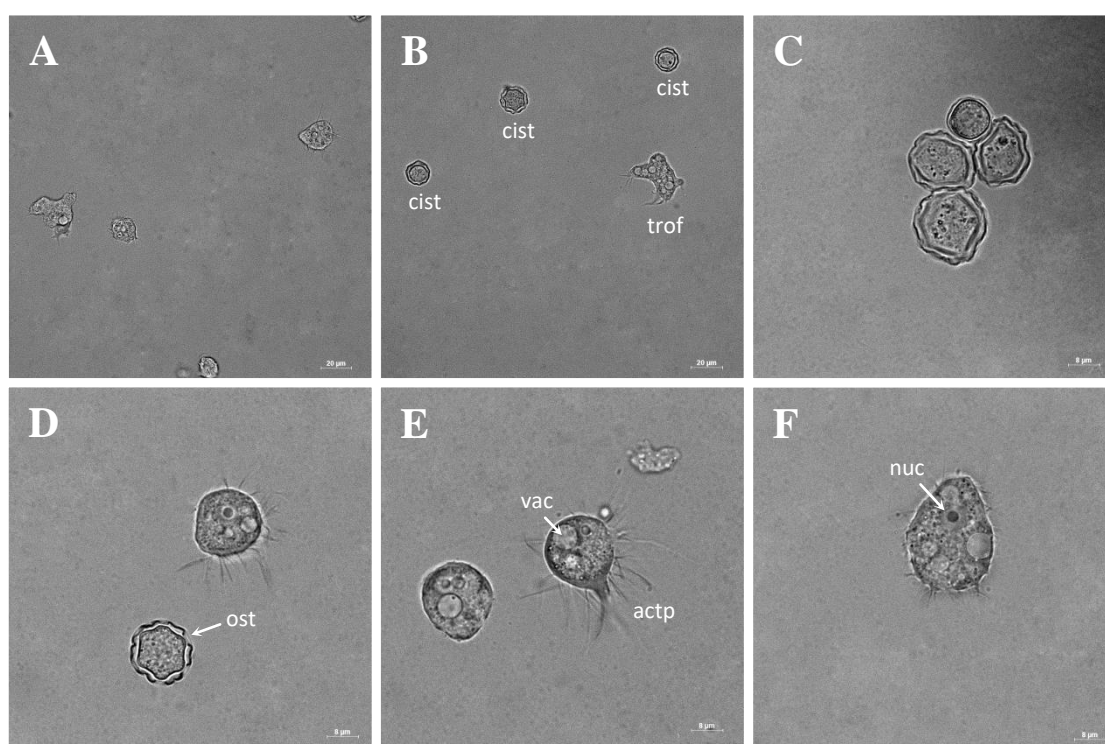


Figura 4. Trofozoítos e cistos em PYG após o 7º dia axenização. **A)** Trofozoítos (Barra: 20 µm); **B)** Trofozoíto (trof) e cistos (cist) **C)** Cistos do grupo morfológico II (Barra: 8 µm); **D)** Cisto do grupo morfológico II, sendo possível observar ostíolos (ost) e um trofozoíto, podendo observar acantapódios, vacúolos e o núcleo (Barra: 8 µm); **E)** Trofozoíto dando evidência aos vacúolos (vac) e aos acantapódios (actp) (Barra: 8 µm); **F)** Trofozoíto dando evidência aos vacúolos e ao núcleo (nuc) (Barra: 8 µm).

5.2. Efeito citopático

As percentagens médias de efeito citopático das culturas **RA**, **RA (3x)**, **LP** e **LP (3x)** foram de 9%, 47%, 0% e 36%, respectivamente, observando-se um significativo aumento ($p < 0,05$) dessa propriedade nas amostras que passaram pelo processo de interação com células MDCK. (**Figura 5**).

A desorganização da monocamada de células, quando o efeito citopático foi mais intenso, pode ser observada na **Figura 6**, que ilustra a destruição causada pelos trofozoítos.

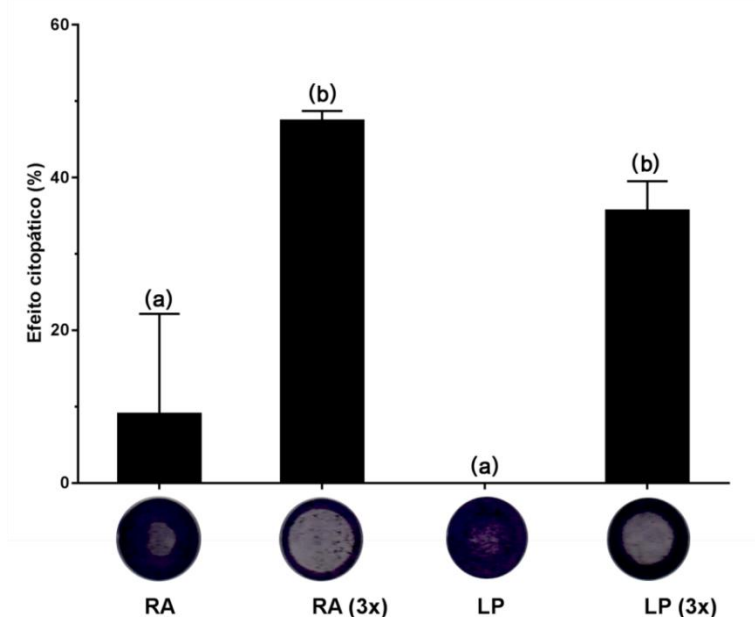


Figura 5. Efeito citopático sobre células MDCK após 24 horas de incubação a 37° C, induzido por trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. A imagem dos círculos mostra o aspecto macroscópico dos poços após o período de incubação. As letras acima das barras representam a significância estatística entre os valores de efeito citopático, sendo letras iguais sem diferença ($p > 0,05$) e letras distintas com diferença ($p < 0,05$).

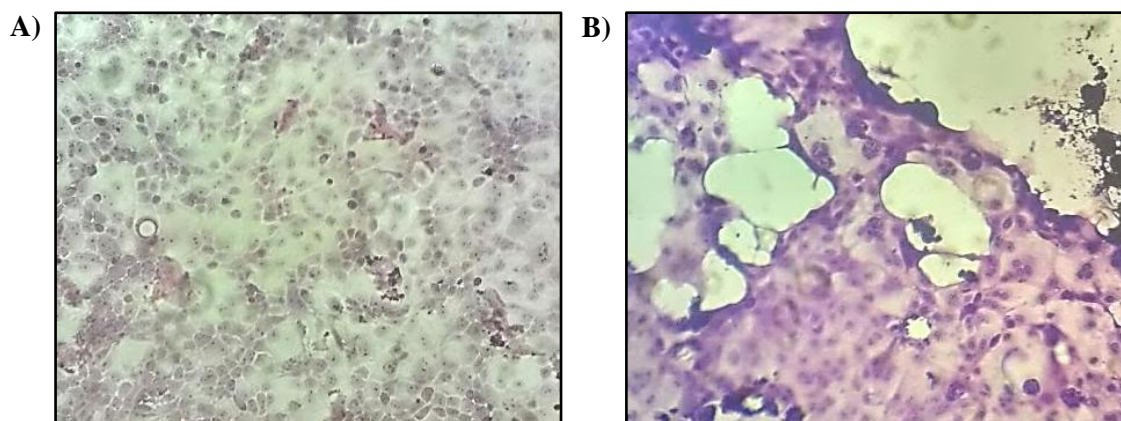


Figura 6. Microscopia de um dos poços da placa antes e depois da exposição aos trofozoítos. **A)** monocamada de células MDCK intactas; **B)** monocamada de células MDCK destruídas por **RA (3x)** (Aumento de 20x).

5.3. Efeito citotóxico

Conforme demonstrado na **Figura 7**, o meio condicionado produzido pelas amebas não foi capaz de gerar dano nas células MDCK, pois a viabilidade dessas foi similar e até maior que a do controle. Não houve diferença significativa entre as diferentes culturas.

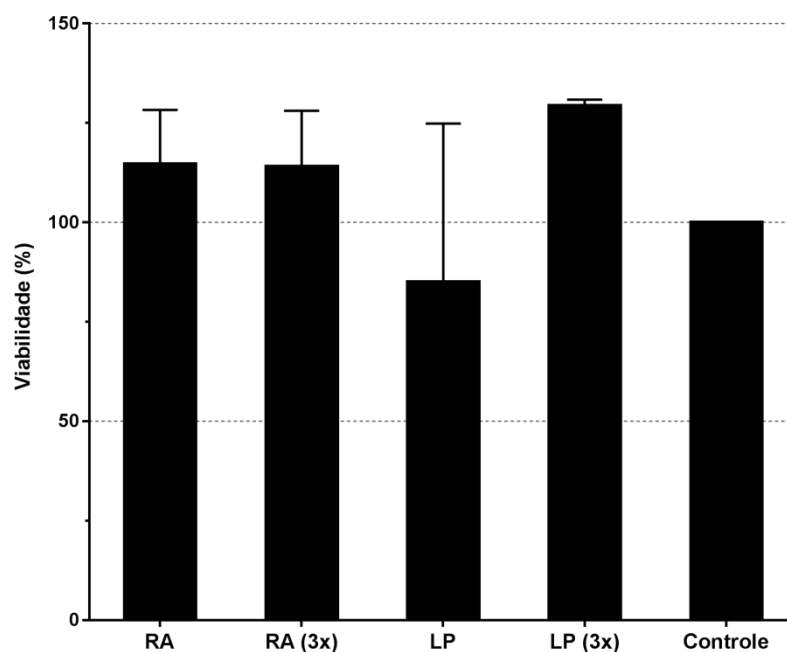


Figura 7. Viabilidade celular após 24 horas de exposição ao meio condicionado das culturas de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três

passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade entre as amostras ($p > 0,05$).

5.4. Zimografia

As proteases produzidas pelas diferentes culturas de *A. castellanii* apresentaram perfil similar composto por duas bandas principais de massa aproximada de 60 kDa e 85 kDa, porém a amostra **LP** e **LP(3x)** mostrou uma banda adicional 133 kDa, sendo que na amostra interagida com células ela está muito mais intensa (**Figura 8**). Todas essas bandas foram inibidas por PMSF, indicando tratar-se de serino-proteases. Outras classes de proteases não foram identificadas.

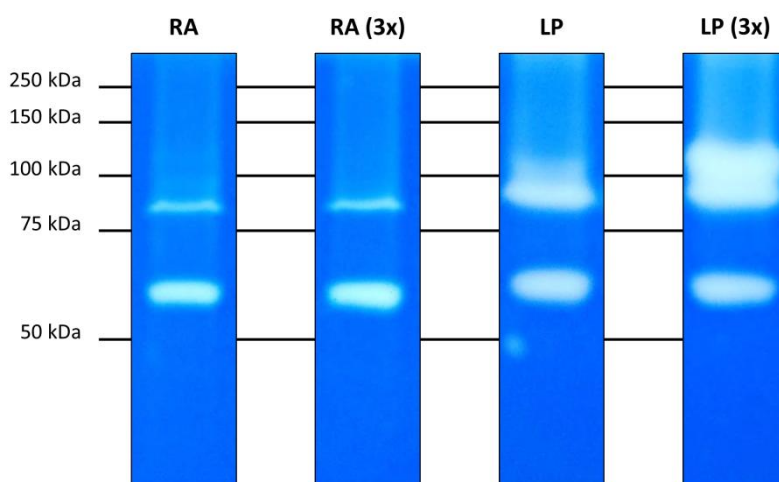


Figura 8. Atividade de proteases secretadas por 10^7 trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* de culturas recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Ensaio de zimografia realizado em gel de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina, em pH 7,2, usando meio condicionado por 10^7 trofozoítos mantidos a 37° C por 24 horas.

5.5. Indução de encistamento

As culturas recém axenizadas, tanto não interagidas (**RA**) como interagidas com MDCK [**RA (3x)**] mantiveram percentagens de encistamento acima de 80% em todo o período do ensaio (**Figura 9**). Já as culturas de longo período [**LP** e **LP (3x)**] apresentaram percentagem de encistamento bem mais baixa às 24 horas (13% e 38%, respectivamente) e foram gradativamente aumentando, culminando às 72 horas com um valor menor da cultura não interagida com MDCK (**LP**, 70%) em relação à que foi interagida [**LP (3x)**, 95%] (**Figura 9**). A percentagem de encistamento ao final do ensaio (72h) foi significativamente menor na amostra **LP** em relação a demais [**RA**, **RA (3x)** e **LP (3x)**].

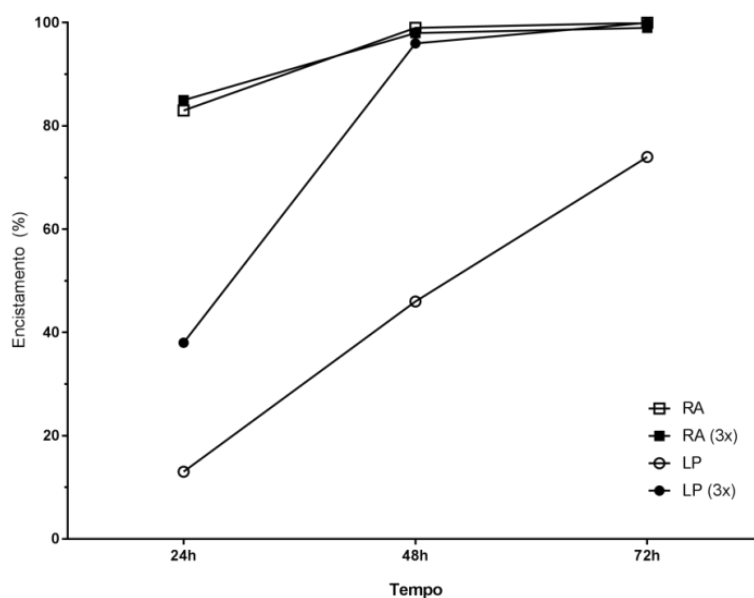


Figura 9. Percentagem de encistamento de culturas de *Acanthamoeba castellanii* recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**]. Às 72 horas, houve diferença significativa da percentagem de encistamento da amostra LP em relação às demais ($p < 0,05$).

5.6. Resistência a clorexidina

As percentagens de viabilidade de trofozoítos das amostras **RA**, **RA (3x)**, **LP** e **LP (3x)**, após tratamento com clorexidina 0,02 % por 24 horas, foram de 12%, 120%, 76% e 5%, respectivamente, indicando sensibilidade alta à droga das amostras **RA** e **LP (3x)** e maior resistência das amostras **RA (3x)** e **LP** (**Figura 10**).

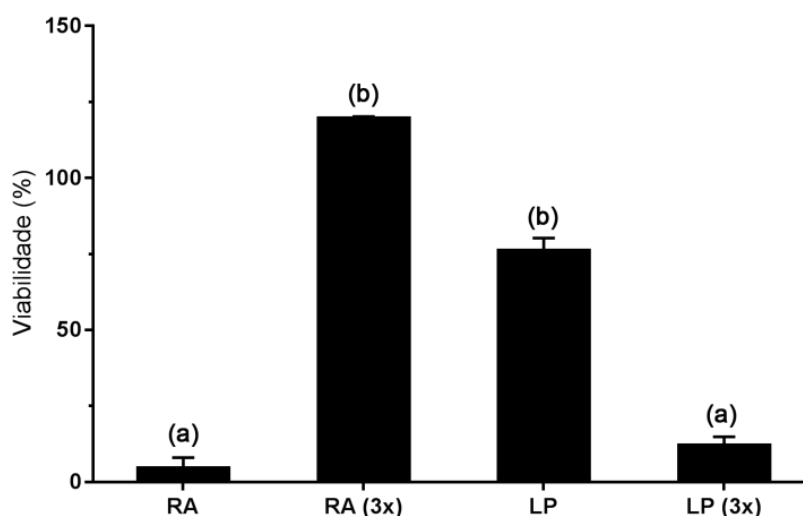


Figura 10. Viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* de culturas recém axenizada (**RA**), recém axenizada e interagida por três passagens com células MDCK [**RA (3x)**], axênicas por longo período (**LP**) e axênicas por longo período e interagida por três passagens com células MDCK [**LP (3x)**], após exposição da clorexidina a 0,02 % no período de 24 horas. As letras acima das barras representam a significância estatística entre os valores de efeito citopático, sendo letras iguais sem diferença ($p > 0,05$) e letras distintas com diferença ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No estudo de diversos patógenos, incluindo protozoários, os avanços no conhecimento do processo invasivo, da variabilidade fenotípica e genotípica, bem como o desenvolvimento de metodologias diagnósticas e terapêuticas, só têm sido possíveis devido à possibilidade de cultivo desses microrganismos, o qual fornece material para investigações *in vitro* e *in vivo*. Em *Acanthamoeba*, o cultivo é realizado com certa facilidade, devido à adaptabilidade da ameba a diferentes condições (SCHUSTER, 2002). O cultivo axênico dessa ameba foi descrito inicialmente por Neff (1957) e desde então diversos estudos sobre o gênero tem sido realizados com amostras nessa condição. No entanto, o cultivo prolongado pode levar a mudanças em certas características originais do isolado, com perda de propriedades de virulência, tanto para *Acanthamoeba* quanto para outros protozoários (NOLAN & HERMAN, 1985; MAZUR & HADAS, 1994). No presente trabalho, procurou-se investigar algumas características *in vitro*, que tem sido associadas à patogenicidade de *Acanthamoeba*, utilizando um isolado clínico axenizado recentemente ou mantido a longo período.

Como passo inicial ao presente estudo, foi necessário recuperar a amostra de uma placa de cultura em ágar soja com *E. coli*, obtida à época do isolamento em 2007. Nessa condição, as amebas ficam em formas císticas e, apesar do tempo longo em estoque, foi possível retomar o crescimento das amebas. Esse fato atesta a capacidade de *Acanthamoeba* em manter-se viável em condições de inanição e o eficiente poder de preservação da sua biologia celular. Mazur, e colaboradores (1995) demonstraram que cistos de *Acanthamoeba* ficaram viáveis por mais de 24 anos após o armazenamento em água a 4 °C. Dessa maneira, em condições normais, os cistos exercem papel fundamental na amplitude de dispersão, não só da própria ameba, mas também de bactérias que, por ventura, foram fagocitadas e não foram digeridas na fase trofozoítica (FOUQUE, et al. 2012).

Após a recuperação, a axenização da amostra para obtenção da cultura denominada **RA** foi realizada com o tratamento de cistos por antibióticos, conforme protocolo descrito anteriormente (DUARTE, et al. 2013) e que também foi usado para axenização da amostra denominada **LP**, em 2007. Na avaliação do comportamento dessas culturas frente à primeira propriedade de patogenicidade, o efeito citopático sobre células MDCK, houve baixo ou nenhum índice de destruição celular. Embora esse resultado contraste com autores anteriores, que consideram que isolados clínicos ou que têm potencial patogênico evidente apresentam índices mais altos de efeito citopático (ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO, 2007; KHAN, et al. 2000), foi possível visualizar um efeito citopático mínimo na cultura **RA**. Isso sugere que a capacidade de causar dano celular existe na amostra, mas que o cultivo prolongado atenua de forma mais intensa essa capacidade, conforme observado pela ausência de efeito citopático na cultura **LP**. Para ambas as culturas, os resultados ainda indicaram que a associação com a cultura celular promove uma reativação da habilidade de exercer efeito citopático, considerando

os índices significativamente mais altos obtidos com as culturas interagidas com células [**RA** (**3x**) e **LP** (**3x**)].

Por outro lado, o efeito citotóxico parece não sofrer alteração relevante relacionada ao cultivo axênico prolongado ou ao contato com células alvo em potencial, considerando a similaridade, nos nossos ensaios, entre a viabilidade celular de MDCK tratadas com meio condicionado das quatro culturas [**RA**, **RA** (**3x**), **LP** e **LP** (**3x**)]. Apesar de haver trabalhos que indicam o efeito citotóxico como importante para determinar expressão de patogenicidade (KHAN, et al. 2000), há a possibilidade de que mecanismos contato-independentes sejam menos relevantes na capacidade invasiva de *Acanthamoeba*. Um estudo de Omana-Molina e colaboradores (2012) indicaram que o meio condicionado de uma amostra de genótipo T4 aparentemente não foi determinante para destruição celular de células MDCK, sendo necessário o contato do trofozoíto com as células para que o dano ocorresse.

Um fato importante observado nos experimentos de efeito citotóxico foi que a interação do meio condicionado de três das amostras [**RA**, **RA** (**3x**) e **LP**] com as células determinou uma percentagem de viabilidade celular maior do que os controles experimentais (viabilidade acima de 100%). Essa observação pode estar relacionada à variabilidade entre as replicatas do ensaio ou ainda, pode indicar que o meio condicionado serviu de substrato para o crescimento da monocamada de célula. Independente de qual explicação é realmente válida, nas condições experimentais aqui utilizadas, não houve diferença desse parâmetro entre amostras recém axenizadas e de longo período, submetidas ou não à interação celular.

No meio condicionado podem estar presentes diversos elementos produzidos pela ameba, sendo as proteases um grupo importante que tem sido avaliado em estudos envolvendo a técnica de zimografia, a qual permite indicar áreas de digestão em géis de corrida eletroforética contendo um substrato genérico, como a gelatina. A quantidade de proteases produzidas tanto somáticas quanto secretadas, bem como seu perfil de produção, parecem estar associados a maior patogenicidade (ALFIERI, et al. 2000; KHAN, et al. 2000; SERRANO-LUNA, et al. 2006; LORENZO-MORALES, et al. 2015). As serino-proteases são as mais identificadas em *Acanthamoeba* (ALFIERI, et al. 2000; LORENZO-MORALES, et al. 2015) e os resultados do ensaio do presente estudo confirmaram esse fato. Duas bandas principais correspondentes a áreas de digestão foram notadas em todas as amostras e uma terceira banda adicional, de cerca de 133 kDa, foi visualizada fracamente na amostra **LP** e mais intensa na amostra **LP** (**3x**). Essa protease pode estar associada a um mecanismo de adaptação ao cultivo prolongado em PYG sendo ativada em maior intensidade após a interação celular, já que estava praticamente ausente nas amostras de axenização recente [**RA** e **RA** (**3x**)]. A banda extra de serino-protease possui peso molecular correspondente à serino-protease MIP-133, que é associada a um perfil

aumentado de virulência (HURT, et al. 2003; CLARKE & NIEDERKORN, 2006; KOESHLER, et al. 2009; CARNT, et al. 2016). É sabido que a mensuração do peso molecular de uma banda em gel de zimografia não é precisa, dessa maneira não é possível ter certeza se a serino-protease encontrada é, de fato, a MIP-133. Contudo, considerando o resultado obtido em **LP (3x)**, é possível observar uma relação entre a o efeito citopático encontrado e a modificação da composição das bandas na zimografia desta amostra. Não é claro o motivo da ausência dessa banda nas amostras recém axenizadas. Uma possibilidade é que a protease esteja presente, mas não na sua forma ativa, hipótese que só poderia ser esclarecida com experimentos adicionais, como análise proteica.

A compreensão da bioquímica e biologia celular que envolve a fase cística ainda é limitada, a ponto de restringir a capacidade de gerir ferramentas utilizadas para cura da CA persistente, em que cistos são encontrados nos tecidos (LLOYD, 2014). Por isso, a capacidade de encistamento tem sido descrita por alguns autores como um aspecto de virulência. Por exemplo, culturas de *Acanthamoeba* axenizadas por longo período foram expostas a células HEp-2, resultando num aumento da produção de cistos com paredes extremamente grossas, mais resistentes ao calor e a antimicrobianos (ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO, 2007; KOESHLER, et al. 2009).

Nos experimentos do presente trabalho, a maior capacidade de encistamento das amostras **RA** e **RA (3x)** pode refletir a manutenção de vias metabólicas para formação de cistos, devido ao tempo mais curto em que foram submetidas ao cultivo axênico a partir de um cultivo em que estavam estocadas na forma de cistos. No cultivo axênico, os repiques regulares mantêm as amebas na sua forma trofozoítica, o que justificaria a perda da capacidade de encistamento rápido das amostras cultivadas por longo período [**LP** e **LP (3x)**]. Segundo Koeshler e colaboradores (2008), também observaram o declínio nas taxas de encistamento sincrônico em cepas após cultivo axênico prolongado, uma hipótese para explicar essa mudança seria a regulação de genes envolvidos no processo de encistamento, por mecanismos epigenéticos. Essa hipótese foi confirmada em um trabalho posterior do grupo, que envolveu o tratamento de culturas de longo período com inibidores de metilação de DNA (50-Azacytidina) e de histona deacetilase (tricostatina A), resultando em aumento da capacidade de encistamento, de forma similar ao efeito da passagem em cultivo celular (KOESHLER, et al. 2009).

Dessa forma, os resultados nos ensaios de encistamento corroboram dados que indicam a perda do potencial de encistamento de culturas em cultivo axênico prolongado (KOESHLER, et al. 2008). Esses autores ainda discutem a ideia de que, na caracterização de patogenicidade pelo critério de capacidade de encistamento, é importante levar em consideração as condições artificiais do cultivo e o seu tempo, os quais podem determinar um processo adaptativo da

linhagem à condição sem pressão seletiva (alimento abundante e condições fisiológicas constantes). Nesse sentido, acreditamos que seria necessário padronizar as condições de avaliação, usando amostras recém-isoladas e rapidamente axenizadas, para determinar se a capacidade ou velocidade de encistamento poderia ser um parâmetro válido para indicar patogenicidade em isolados de *Acanthamoeba*. Além disso, concordamos com os autores (KOESHLER, et al. 2008) na colocação de que seria necessário testar um número maior de linhagens para determinar se existe um padrão que justifique de fato, associar encistamento com patogenicidade.

Com relação aos ensaios de resistência a clorexidina, os dados mostraram uma variabilidade considerável entre as quatro amostras testadas. A suscetibilidade à droga na amostra de longo termo (**LP**) foi bem maior após a interação celular [**LP (3x)**]. De forma similar, Koeshler e colaboradores (2009) demonstraram que uma cultura axênica de *Acanthamoeba* submetida à interação com células HEP-2 apresentou maior suscetibilidade ao agente antiamebocida N-clorotaurina. Os autores sugerem que a alta taxa de fagocitose requerida para digerir as células HEP-2 levaria a alterações da membrana que aumentariam a internalização da droga. Eles ainda mencionam que Noble e colaboradores (2002) relataram aumento de suscetibilidade a polihexametileno-biguanida quando em presença de bactérias que podiam ser fagocitadas por *Acanthamoeba*. Esse mecanismo de aumento de suscetibilidade poderia explicar os dados obtidos para **LP** e **LP (3x)**, porém em um padrão oposto, a amostra recém axenizada (**RA**) apresentou suscetibilidade menor após interação com células [**RA (3x)**]. Embora não haja explicação clara para essa divergência, uma hipótese é que a ameba apresente diferentes mecanismos de desenvolvimento de resistência, que atuariam de forma distinta na amostra recém axenizada e na de longo período de cultivo. Uma implicação dessa divergência de comportamento da cultura de longo período e recém axenizada é na avaliação de suscetibilidade de *Acanthamoeba* a fármacos e substâncias desinfetantes. É possível que o tempo de cultura possa afetar os resultados de testes de drogas, fato que já foi descrito em teste de resistência de cistos a antiamebicidas (HUGHES, et al. 2003).

Em resumo, os dados obtidos nesse trabalho confirmaram o potencial patogênico da amostra, especialmente pelo critério de capacidade de indução de efeito citopático, em concordância com sua condição de isolado clínico e seu genótipo. Destaca-se que a estirpe de *Acanthamoeba* usada neste estudo é proveniente de um caso de CA, tendo sido caracterizada como representante do grupo morfológico II e genótipo T4 (DUARTE, et al. 2013) que, não só parece ser o mais abundante no meio ambiente, mas também o mais envolvido em casos de acantamebíase, mesmo levando em conta sua maior ocorrência também no ambiente (WALOCHNIK, et al. 2000; MACIVER, et al. 2013). Houve também evidente atenuação do efeito citopático devido ao cultivo axênico prolongado e a interação com células promoveu a

recuperação da capacidade das amebas em lesar as células. A capacidade de encistamento rápido também é um critério afetado pelo cultivo prolongado, porém não com tanta intensidade quanto o observado para o efeito citopático, pois as amebas em longo período mantiveram a produção de cistos, ainda que demandando mais tempo para atingir percentagens mais elevadas. Essa propriedade também foi recuperável por passagem em células.

7. CONCLUSÃO

- Foi possível recuperar a amostra original de *Acanthamoeba* obtida de raspado de córnea e mantida em estoque há nove anos, gerando trofozoítos suficientes para os testes;
- A interação intercelular entre *Acanthamoeba* e MDCK possuiu papel fundamental na mudança do comportamento destrutivo da ameba, gerando danos maiores do que quando não interagido com as células. A partir daí, conclui-se que a amostra **LP (3x)** não só recuperou sua virulência, como também ficou mais patogênica que **RA**. Portanto, a perda e a recuperação de aspectos de patogenicidade configuram um comportamento característico do gênero;
- O meio condicionado não gerou efeito citotóxico à monocamada de células. Ao contrário do que se esperava, o meio condicionado serviu de substrato para o crescimento celular. Essa constatação vale para todas as amostras utilizadas pelo estudo. Portanto, de acordo com a metodologia proposta, a utilização de meio condicionado para gerar um efeito citotóxico não demonstrou ser um parâmetro válido para verificar a patogenicidade de *Acanthamoeba*. Tal fato indica que a lesão do tecido só poderia ocorrer quando houvesse a interação direta entre parasito e hospedeiro ou talvez com o aumento do número de trofozoítos utilizados para a produção do meio condicionado;
- O ensaio de Zimografia foi eficiente ao identificar a atividade de proteases secretadas pelas amostras. Embora não se saiba a função de muita das proteases secretadas por *Acanthamoeba*, o aumento da banda obtido em **LP (3x)** aponta para uma relação com o efeito citopático. Não ficou claro o motivo da ausência dessa banda nas amostras recém axenizadas. Uma possibilidade é que a protease esteja presente, mas não na sua forma ativa, hipótese que só poderia ser esclarecida com experimentos adicionais, como análise proteica. De maneira geral, o estudo destas proteases pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento da CA;
- Os níveis de encistamento foram diferentes. Por conta do longo período encistada, a amostra original estocada (**RA**) obteve altos níveis de encistamento logo nas primeiras 24 horas, assim como sua amostra equivalente [**RA (3x)**] após passagem em cultura celular. Diferentemente, por conta dos repiques regulares, a amostra de cultivo axênico prolongado (**LP**), obteve baixos índices de encistamento e quando sofreu passagem em cultivo celular [**LP (3x)**] tais índices aumentaram dentro de 72

horas. Portanto, apesar da passagem em células demonstrar um aumento do índice de encistamento, a amostra estoque que não sofre passagem também obteve altos índices de encistamento. Nesse sentido, questiona-se o encistamento como parâmetro válido para indicar patogenicidade em isolados de *Acanthamoeba*;

- O teste de resistência a clorexidina demonstrou, que possivelmente, devido aos diferentes contextos de manutenção da cultura em que as amostras foram submetidas nos últimos nove anos, evidenciou-se uma plasticidade nos mecanismos de resistência à droga;
- A utilização da linhagem celular MDCK respondeu bem ao ensaio proposto, uma vez que esta se comportou como uma monocamada de células firmemente aderidas com a finalidade de simular uma barreira epitelial *in vivo*, garantindo reprodutibilidade. Portanto, uma alternativa para pesquisadores que mantêm as cepas de *Acanthamoeba* por um período de repiques sucessivos, é utilizar a cultura de células de mamíferos, como a MDCK, para restaurar as características da estirpe.

8. REFERÊNCIAS

ABBOT, R.L.; ELANDER, T.R. *Acanthamoeba* Keratitis. In: Tasman W, Jaeger EA, eds. Duane Clinical Ophthalmology. Philadelphia: JB Lippincott. v.4, n.18, 1995.

ALSAM, S.; JEONG, S.R.; DUDLEY, R.; KHAN, N.A. Role of human tear fluid in *Acanthamoeba* interactions with the human corneal epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 3-4, p. 329–336, 2008.

ALVARENGA, L. S.; DE FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*, **ARQ. BRAS. OFTAL.** v.63, n.2, 2000.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: A review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016.

CARVALHO, F.R.; FORONDA A.S.; MANNIS, M.J.; HÖFLING-LIMA, A.L.; BELFORT, R. JR.; DE FREITAS, D. Twenty years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, v.28, n.5, 2009.

CASTRILLÓN, J.; OROZCO, L. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista chilena Infectol**, v. 30, n. 2, p. 147 – 155, 2013.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; RAMÍREZ-FLORES, E.; LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba* culbertsoni : Electron-Dense Granules in a Highly Virulent Clinical Isolate. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n.6, p. 744–750, 2016.

CLARKE D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends Parasitol.** v. 22, n. 4, p. 175-80, 2006.

COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, G. A.; FURST, C.; CROZETA, M.A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Parana, Brazil. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 57, p. 70-75, 2010.

DE JONKHEERE, J.F. Ecology of *Acanthamoeba*: **Rev Infect Dis**, v.13 (Suppl.5) p.385-7, 1991.

DE JONKHEERE, J.F.; VAN DE VOORDE, H. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. **Am J Trop Med Hyg**, v.26, n.10, 1977.

DUARTE, J. L.; , FURST, C.; , KLISIOWICZ, D. R.; , KLASSEN, G.; , COSTA, A. O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**. v.135, p.9–14, 2013.

FORONDA, A.S. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. [Tese de doutoramento] Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 1979.

FOUQUE, E.; TROUILHÉ, M.; THOMAS, V.; HARTEMANN, P.; RODIER, M.; HÉCHARD, Y. Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. **Eukaryot Cell**. v.11, n.4, p.382–387, 2012.

FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. In: ____ Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 5 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, cap.22, 2005.

FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 69–84, 2015.

GONZÁLEZ-ROBLES, A.; CASTAÑÓN, G.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; LÁZARO-HALLER, A.; OMAÑA-MOLINA, M.; BONILLA, P.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba castellanii*: Structural basis of the cytopathic mechanisms. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 133–140, 2006.

GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L.; OMAÑA-MOLINA, M.; LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba royreba*: Morphological features and in vitro cytopathic effect. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 369–375, 2013.

GRAY, L. D.; GILLIAN, P. H.; FOWLER, W. G. **Cumitech 13b: Laboratory Diagnosis of Ocular Infections**. 1 ed. Washington: ASM Press, 2010.

GRIFFIN, J.L. Pathogenic free-living amoebae. In Kreier JP(ed). **Parasitic Protozoa**. London: Academic Press, 145-87, 1977.

GRIMM, F.; BRUN, R.; JENNI, L. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. **Parasitol Res**. v.77, n.3, p.185-91, 1991.

HUGHES, R.; HEASELGRAVE, W.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.47, n.10, p.3080–3084, 2003.

HURT, M.; NIEDERKORN, J.; ALIZADEH, H. Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3424–3431, 2003.

ILLINGWORTH, C.D.; COOK, S.D. *Acanthamoeba* Keratitis. **Surv Ophthalmol**; v.42, n.6, p.493-508, 1998.

JOHN, D.T.; JOHN, R.A. Enhancement of virulence of *Naegleria fowleri* by growth in Vero-cell cultures. **J Parasitol**, v.80, p.149–151, 1994.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T. A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2858–2861, 2000.

KIM, W.; KONG, H.; HA, Y.; HONG, Y.; JEONG, H. J.; YU, H. S.; CHUNG, D. Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. **Korean Journal of Parasitology**. v. 44, n. 4, p.321-330, 2006.

KINNEAR, F.B. *Acanthamoeba* pathogenicity of corneal cells. **Journal of Infection**, v.49, n.4, p.310–316, 2004.

KOEHSLER, M.; LEITSCH, D.; DUCHÊNE, M.; NAGL, M.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba castellanii* : growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. **FEMS microbiology letters**, v. 299, n. 2, p. 121–127, 2009.

KUPCSIK, L. Estimaion of Cell Number Based on Metabolic Acivity: The MTT eduction Assay. In: STODDART, M.J. Mammalian Cell Viabiliy: Methods and Protocols. Nova York: Humana Press, cap.3, 2011.

LLOYD, D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. **Experimental Parasitology**. v.145, p.20–27, 2014.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite** (Paris, France), v. 22, p. 10, 2015.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍN-NAVARRO, C.M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; ARNALICH-MONTIEL, F.; PIÑERO, J.E.; VALLADARES, B. *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

- MACIVER, S. K.; ASIF, M.; SIMMEN, M. W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **Eur. J. Protistol.** v.49, n.2, p.217-21, 2013
- MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DÍAZ, A. L.; IZQUIEDO, F.; FENOY, S. E DEL AGUILA, C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2845–2850, 2014.
- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.
- MATTANA, A.; TOZZI, M. G.; COSTA, M.; DELOGU, G.; FIORI, P. L.; CAPPUCCINELLI, P. By releasing ADP, *Acanthamoeba castellanii* causes an increase in the cytosolic free calcium concentration and apoptosis in wish cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4134–4140, 2001.
- MAZUR, T.; HADAS, E. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. **Parasitol Res.**, v. 80, n.5, p. 431-4, 1994.
- MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.** v.46, p.106-108. 1995.
- MORTAZAVI, P. N.; GOLDSWORTHY, G.; KIRK, R.; KHAN, N. A. Novel model for the in vivo study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp. (T4 genotype). **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 503–508, 2009.
- MUTOH, T.; ISHIKAWA, I.; MATSUMOTO, Y.; CHIKUDA, M. A retrospective study of nine cases of *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Ophthalmology** (Auckland, N.Z.), v.4, p.1189–1192, 2010.
- NEFF, R. J. Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba. *Acanthamoeba* sp. **J. Protozool**, v.4, p.176–182, 1957.
- Noble JA, Ahearn DG, Avery SV, Crow Jr. SA. Phagocytosis Affects Biguanide Sensitivity of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.46, n.7, p.2069-2076, 2002.
- NOLAN, T.J.; HERMAN, R. Effects of long-term *in vitro* cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. **J Protozool**, v.32, n.1, p.70-5, 1985.

OMAHNA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; SALAZAR-VILLATORO, L. I.; LORENZO-MORALES, J.; CRISTÓBAL-RAMOS, A. R.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I.; TALAMÁS-ROHANA, P.; CRUZ, A. R. M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Reevaluating the role of *Acanthamoeba* proteases in tissue invasion: Observation of cytopathogenic mechanisms on MDCK cell monolayers and hamster corneal cells. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

PUMIDONMING, W.; KOEHLER, M.; LEITSCH, D.; WALOCHNIK, J. Protein profiles and immunoreactivities of *Acanthamoeba* morphological groups and genotypes. **Experimental Parasitology**, v.145, p.50-56, 2014.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphology de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 8, p. 557-598, 1977.

ROCHA-AZEVEDO, B.; SILVA-FILHO F. C. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba* polyphaga: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch Microbiol**, v.188, p.441–449, 2007.

ROWBOTHAM, T.J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **Journal of Clinical Pathology**, v.33, n.12, p.1179-1183, 1980.

SALAZAR, H.C; MOURA, H.; RAMOS, R.T. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Rev Saúde Publ S. Paulo**, v.16, p.261-7, 1982.

SANT'ANA, V. P.; CARRIJO-CARVALHO, L. C.; FORONDA, A. S.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE FREITAS, D.; CARVALHO, F. R. S. Cytotoxic activity and degradation patterns of structural proteins by corneal isolates of *Acanthamoeba* spp. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 253, n. 1, p. 65–75, 2014.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.3, p.342–354, 2002.

SERRANO-LUNA, JDE. J.; CERVANTES-SANDOVAL, I.; CALDERÓN, J.; NAVARRO-GARCÍA, F.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. **Can J Microbiol**, v.52, n.1, p.16-23, 2006.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 6, 2012.

SOUZA-CARVALHO, F. R.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FORONDA, A.S.; DE FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with

differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 603–609, 2011.

STOPAK, S. S.; ROUT, M.I.; NAUHEIM, R.C.; TURGEON, P.W.; SOSSI, G.; KOWALSHI, R.P.; THOFT, R.A. Growth of *Acanthamoeba* on Human Corneal Epithelial-Cells and Keratocytes Invitro. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, n. 2, p. 354–359, 1991.

TU, E.Y.; JOSLIN, C.E.; NIJM, L.M.; FEDER, R.S.; JAIN, S.; SHOFF, M.E. Polymicrobial Keratitis: *Acanthamoeba* and Infectious Crystalline Keratopathy. **American Journal of Ophthalmology**. v.148, n.1, p.13–19, 2009;

VERÍSSIMO, C.D.M.; MASCHIO, V.J.; CORREA, A.P.F.; BRANDELLI, A.; ROTT, M.B. Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.108, n.7, p.832-835, 2013.

VISVESVARA, G.S.; BALAMUTH, W. Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*. **J Protozool**, v.22, p.245–256, 1975.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.30, n.20, p.151-158, 2008

VISVESVARA, G.S.; STHERR-GREEN, J. Epidemiology of free-living ameba infection. **J Protozool**, v.37, p.25-33, 1990.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl Environ Microbiol**. v.66, n.10, p.4408–4413, 2000.

YOKOGAWA, H.; KOBAYASHI, A.; YAMAZAKI, N.; ISHIBASHI, Y.; OIKAWA, Y.; TOKORO, M.; SUGIYAMA, K. Bowman's layer encystment in cases of persistent *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Ophthalmology**, v.6, p.1245–1251, 2012.